

アロキサン糖尿病ウサギに於けるビタミンB2代謝に関する実験的研究

著者	佐藤 光子
号	344
発行年	1966
URL	http://hdl.handle.net/10097/18271

氏 名 (本 籍) さ と み こ
佐 藤 光 子

学 位 の 種 類 医 学 博 士

学 位 記 番 号 医 第 3 4 4 号

学 位 授 与 年 月 日 昭 和 4 1 年 3 月 4 日

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当

最 終 学 歴 昭 和 3 4 年 3 月
東北大学医学部卒業

学 位 論 文 題 目 アロキササン糖尿病ウサギに於けるビタミン B₂
代謝に関する実験的研究

(主 査)

論 文 審 査 委 員 教 授 荒 川 雅 男 教 授 山 形 徹 一

教 授 菊 地 吾 郎

論 文 内 容 要 旨

糖尿病に於いて B_2 欠乏症状が起り、その発現機序は B_2 の利用障碍に基ずくものである事は知られているが、それが如何なる機転によるものであるか明らかでない。私は糖尿病の B_2 代謝機構を知る為に、Alloxan糖尿病兎に於いて B_2 負荷試験を行い、血液、血漿、血球に分けてその動態を知ると同時に、Alloxan糖尿病肝の Flavokinase 活性並びに総 B_2 量とその三型分割を、正常兎と比較測定した。

実 験 方 法

体重 2.5～3.5 Kg の兎を用い、5% Alloxan monohydrate を 200 mg/Kg の割合で耳静脈内注射し糖尿病を催起せしめた。試験兎については血糖及び尿糖を測定し発現する糖尿病の指標とし、Alloxan 投与後 5 日～1 週間目に於いて高血糖を認めた兎について実験を行つた。

B_2 負荷試験： B_2 負荷前及び FR 1 mg 皮下注射後 30 分、2 時間の血中及び血漿中総 B_2 、結合型 B_2 を測定した。血球の値はヘマトクリフトより算出した。

肝 B_2 測定：頸動脈より充分脱血死亡せしめ、肝総 B_2 量及びその三型分割を測定した。

肝 Flavokinase 活性測定：兎を出血死亡せしめてすみやかに肝を取り出し、その 7～10 gr を細切し生食でリンスして 4 倍量の 0.05 M potassium phosphate Buffer pH 7 を加え homogenate した後、18500×g 30 分冷凍遠沈して上清を得、その蛋白濃度を測定した。以上 4℃ 以下で操作を行つた。反応液 total volume 5 ml 中 10^{-5} M FR, 10^{-3} M ATP, 10^{-4} M Zn^{++} , 0.075 M potassium phosphate Buffer, pH 8.5 mg 又は 10 mg の蛋白量を含む肝ホモジネート上清の混合液を、37℃ 1 時間暗所で反応させた後、17.5% TCA を加えて反応を停止せしめて後総 B_2 及び結合型 B_2 を測定した。対照としては上記混合液を反応させる前のものを使用した。この反応系に於いて反応後生成される物質は FMN のみである事が Mc Cormick によりすでに明らかにされているので、Flavokinase 活性はエステル化率として次式をもつて表わした。

$$\text{エステル化率} = \text{反応後の} \frac{\text{結合型 } B_2}{\text{総 } B_2} \times 100 - \text{対照の} \frac{\text{結合型 } B_2}{\text{総 } B_2} \times 100$$

B_2 測定はルミフラビン螢光法、結合型 B_2 の定量は藤田、松沼のベンジルアルコールを用いる方法、 B_2 三型は Crammer の濃縮法によつた。

実 験 成 績

1. B_2 負荷試験： B_2 負荷前血中総 B_2 量は正常兎平均 $21.1 \pm 0.6 \gamma/dl$, Alloxan 兎平均 $19.6 \pm 1.2 \gamma/dl$ で有意差ないが、結合型 B_2 は正常兎平均 $17.9 \pm 0.6 \gamma/dl$, Alloxan 兎平均 $16.1 \pm 0.7 \gamma/dl$ で後者が低く、Alloxan 兎でエステル比の低下を認めた。 B_2

負荷後30分の血中総 B_2 量は、正常兎平均 $31.2 \pm 0.6 \text{ } \mu\text{g}/\text{dl}$ に対しAlloxan兎は平均 $40.6 \pm 0.8 \text{ } \mu\text{g}/\text{dl}$ と非常に高値を示し、二時間後も正常兎平均 $22.3 \pm 1.1 \text{ } \mu\text{g}/\text{dl}$ とほぼ負荷前値に復しているのに反し、Alloxan兎は平均 $30.1 \pm 1.0 \text{ } \mu\text{g}/\text{dl}$ と停滞して負荷前値に復さない。血液 B_2 の動きは血漿の動きと同じ動きを示し、血漿並びに結合型 B_2 は負荷前後とも変動を示さない。

2. 肝 B_2 量：肝総 B_2 量は、正常兎平均 $28.16 \pm 1.17 \text{ } \mu\text{g}/\text{g}$ であるのに反し、Alloxan兎は平均 $23.50 \pm 1.17 \text{ } \mu\text{g}/\text{g}$ で明らかに低値を示した。肝 B_2 三型の割合は、正常兎でFAD $86.08 \pm 0.51\%$, FMN $11.70 \pm 0.60\%$, FR $2.23 \pm 0.14\%$ に対し、Alloxan兎では、FAD $85.99 \pm 1.93\%$, FMN $11.81 \pm 1.55\%$, FR $2.40 \pm 0.39\%$ で、FAD, FMN, FRとも正常肝と比較して有意差を認めなかつた。

3. 肝Flavokinase活性：正常肝に於いては蛋白量5mgを含む肝ホモジネート上清を反応させた場合平均 1.56 ± 0.13 , 10mgを含む肝ホモジネート上清を反応させた場合平均 2.12 ± 0.21 であり、一方Alloxan兎に於いては、蛋白量5mgを含む肝ホモジネート上清を反応させた場合平均 1.51 ± 0.11 , 10mgを含む肝ホモジネート上清を反応させた場合平均 2.14 ± 0.22 で、いずれも正常兎肝Flavokinase活性に比して低下を認めなかつた。

考 按

糖尿病に於ける B_2 利用障害の発生機序について高橋は、糖尿病に於けるGlycolysisの障害がATPの生成不足を招いて B_2 の燐酸エステル化の障害を来すためであろうと推論している。私は B_2 が体内で利用される形になるための一段階であるFR→FMNに関するFactorとしてATPと同時にFlavokinaseの活性も重要なFactorであると考え、糖尿病に於ける B_2 利用障害の発現に関して糖尿病肝Flavokinaseの活性低下があることも予想されると考えた。肝FlavokinaseはMcCormickによりその存在が明らかにされたが、これまで糖尿病に於ける肝Flavokinase活性測定についての報告はまだ見当たらない。一方もく糖尿病に於いて肝Flavokinase活性低下があるとすれば、肝FMNの減少を来すことが容易に想像される。これまでの実験糖尿病動物の肝 B_2 に関する報告をみると、肝総 B_2 量の低下は認められているが B_2 三型の割合については報告者によりまちまちで、その変化の傾向及び意味づけがなされていない。従つて、糖尿病に於いて肝Flavokinase活性と、肝総 B_2 及びその三型分割を同時に測定することは、糖尿病に於ける B_2 代謝機構を知る上に有意義な事であると考えて本実験を試みた。 B_2 負荷試験の結果は前述の如く利用障害の存在が明らかであつた。肝 B_2 については、肝総 B_2 量は明らかに低下をみたが、その三型分割の割合は正常肝と比較して有意差は認められなかつた。又肝Flavokinase活性についても、本測定法に於いて、正常肝と差を認めることが出来なかつた。以上の結果より糖尿病に於ける B_2 利用障害の発生機序は、高橋の述べた如くGlycolysisの障害に基づくATPの産生不足による B_2 の燐酸化障害に基づくものであると考えられる。

審 査 結 果 の 要 旨

本研究は、アロキサン糖尿ウサギにおいて、血中エステル型B₂の低下、および負荷遊離型B₂の血中停滞をみとめ、このB₂の利用不全は、肝フラボカイネスの活性低下によるものではないかとの想定の下に、~~本酵素~~酵素活性を測定した。しかし、肝ホモジエネートを用いた測定成績においては、アロキサン糖尿ウサギのフラボカイネース活性は正常ウサギのそれと同様であり、予想した低下はみられなかつた。そこで著者は、アロキサン糖尿ウサギにおけるB₂の利用不全(エステル化不全)はグリコーシス~~の~~の障碍に基くA T Pの不足によるB₂の磷酸化障碍によるものであらうという説に賛意を表している。

よつて本論文は学位を授与するに値するものと認める。